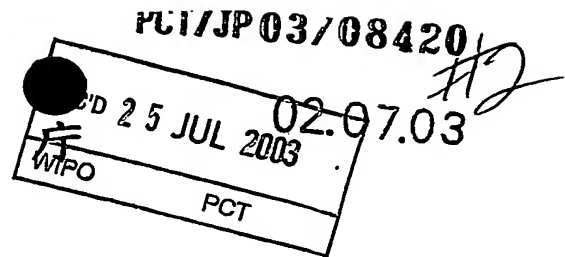


Rec'd PCT/PTO 03 JAN 2005

日 本 国 特 許  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2003年 2月 6日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2003-029846

[ST.10/C]:

[JP2003-029846]

出 願 人  
Applicant(s):

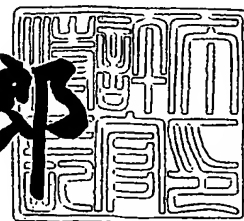
小野薬品工業株式会社  
本 庶 佑

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3041915

【書類名】 特許願

【整理番号】 ONP4478

【提出日】 平成15年 2月 6日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 A61P 31/00  
A61P 35/00  
A61P 37/00

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉大鷲町 1 9 - 4

    【氏名】 本庶 佑

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区高野上竹屋町 1 0 - 3 6

    【氏名】 湊 長博

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市上京区上生洲町 2 0 1 - 4 0 3

    【氏名】 岩井 佳子

【特許出願人】

    【識別番号】 000185983

    【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 1 番 5 号

    【氏名又は名称】 小野薬品工業株式会社

    【代表者】 松本 公一郎

【特許出願人】

    【識別番号】 396023812

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉大鷲町 1 9 - 4

    【氏名又は名称】 本庶 佑

【代理人】

    【識別番号】 100081086

    【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ  
ル 7 階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 大家 邦久

【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100117732

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 信彦

【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100121050

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 林 篤史

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0209021

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌もしくは感染症治療のための免疫賦活剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 PD-1 または PD-L1 によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する活性を有する免疫賦活剤。

【請求項 2】 PD-1 と PD-L1 との相互作用を選択的に阻害する活性を有する請求項 1 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 3】 PD-1 または PD-L1 に結合して、その機能を阻害する活性を有する請求項 1 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 4】 PD-1 の細胞内ドメインからの抑制シグナルを阻害する活性を有する請求項 1 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 5】 PD-1 または PD-L1 の産生を阻害する活性を有する請求項 1 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 6】 ポリペプチド、その誘導体、有機合成化合物、天然物またはポリヌクレオチドから選択される、請求項 1 乃至 5 に記載のいずれかの活性を有する物質を有効成分とする免疫賦活剤。

【請求項 7】 請求項 2 または 3 に記載の活性を有する PD-1 または PD-L1 に対する抗体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の抗体を有効成分とする請求項 2 または 3 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 9】 癌治療に用いることができる請求項 6 または 8 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 10】 感染症治療に用いることができる請求項 6 または 8 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 11】 PD-L1 を発現する細胞を用いて、請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の阻害活性を評価して選別することを特徴とする癌もしくは感染症の治療剤候補のインビトロスクリーニング方法。

【請求項 12】 PD-L1 を安定に発現するように形質転換された請求項 11 に記載のスクリーニング方法で使用される腫瘍細胞株。

【請求項13】 PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植し、請求項1乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価して選別することを特徴とする癌の治療剤のインビボ評価法。

【請求項14】 請求項13のインビボ評価法に用いられる、PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植された腫瘍移植マウス。

【請求項15】 請求項9または10に記載の免疫賦活剤および薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする癌治療または感染症治療用医薬組成物。

【請求項16】 請求項9記載の免疫賦活剤と、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤およびその他抗癌剤から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療用医薬組成物。

【請求項17】 請求項9記載の免疫賦活剤と、白血球減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤および癌性疼痛治療薬から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療補助用医薬組成物。

【請求項18】 請求項10記載の免疫賦活剤と、抗HIV剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤および内臓真菌症治療薬から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる感染症治療用医薬組成物。

【請求項19】 体外でPD-1の発現を阻害する遺伝子操作を施し、さらに増殖および分化させ、腫瘍、ウイルスまたは病原体に対する免疫反応を活性化させた患者由来のリンパ球細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、PD-1、PD-L1またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする治療剤の癌もしくは感染症の免疫療法における新たな使用方法に関する。

さらに詳しく言えば、PD-1、PD-L1またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する免疫賦活剤、その免疫賦活剤を用いた癌治療または感染症治療、その癌または感染症治療のための免疫賦活剤インビトロスクリーニング方法、前記方法に使用される腫瘍細胞株、癌の治療剤を選別するインビボ評価法、その評価に用いられる腫瘍移植マウス、癌治療のための医薬組成物、感染症治療のための医薬組成物、および免疫反応を活性化させたリンパ球細胞に関する。

#### 【0002】

##### 【発明の背景】

免疫療法は、ほとんどの薬物療法において不可避な副作用が少なく、極めて特異性の高い治療方法として期待されている。特に、癌治療や感染症治療における薬物療法が、患者に対して大きな負担を課す治療方法であるために、患者のQOL（クオリティ・オブ・ライフ）の回復が重要視されているが、免疫療法は、ヒトがもともと備えている免疫反応を外因的な方法によって賦活化させ、薬物投与による負担の一部を肩代わりさせることによって、患者のQOLを回復させる目的のもとに行うことができる。

#### 【0003】

免疫の賦活化は、Tリンパ球細胞の免疫反応を活性化させる方法で行うことができる。T細胞の活性化には、抗原レセプター（TCR）を介した刺激だけでなく、共役刺激分子群（例えば、CD28）を介した付加的な刺激誘導が必要であるといわれている。一方、最近、共役刺激分子群と相同的な構造を有する分子群、CTLA-4とPD-1が発見され、抗原レセプター（TCR）シグナルを抑制するシグナルを発していることが報告されている。T細胞の活性化の方法として、この共役抑制分子の機能を抑制することも有効な1つの手段であると考えられている。

#### 【0004】

PD-1は免疫グロブリンファミリーに属する55kDのI型膜タンパクとしてクローニングされ（ザ・エンボ・ジャーナル（The EMBO Journal）, 1992年, 第11巻, 第11号, p.3887~3895（非特許文献1））、特開平5-336973号公

報(特許文献1)、EMBL/GenBank Acc. No. X67914、特開平7-291996号公報(特許文献2)参照)、その発現は、胸腺細胞においてはCD4-CD8-からCD4+CD8+細胞に分化する際に認められる(インターナショナル・イムノロジー(International Immunology), 1996年, 第18巻, 第5号, p.773~780(非特許文献2)、ジャーナル・エクスペリメンタル・メディスン(Journal of Experimental Medicine), 2000年, 第191巻, 第5号, p.891~898(非特許文献3)参照)。また、末梢におけるPD-1の発現は、抗原レセプターからの刺激により活性化したT細胞、B細胞(インターナショナル・イムノロジー(International Immunology), 1996年, 第18巻, 第5号, p.765~772(非特許文献4)参照)および活性化マクロファージを含む骨髓細胞に認められることが報告されている。PD-1の細胞内領域には、ITIMモチーフ(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)があり、免疫反応に対する抑制ドメインと考えられている。さらに、PD-1欠損マウスが、糸球体腎炎、関節炎といったループス様自己免疫病(C57BL/6遺伝子背景)(インターナショナル・イムノロジー(International Immunology), 1998年, 第10巻, 第10号, p.1563~1572(非特許文献5)、イムニティー(Immunity), 1999年, 第11巻, 第2号, p.141~151(非特許文献6)参照)や拡張性心筋症様疾患(BALB/c遺伝子背景)(サイエンス(Science), 2001年, 第291巻, 第5502号, p.319~332(非特許文献7)参照)を発症することから、PD-1が自己免疫疾患発症の、特に末梢自己免疫寛容の制御因子であることも示唆されている。

#### 【0005】

PD-1のリガンドであるPD-L1(EMBL/GenBank Acc. No. AF233516またはNM021893)は、活性化した単球や樹状細胞などのいわゆる抗原提示細胞に発現している(ジャーナル・エクスペリメンタル・メディスン(Journal of Experimental Medicine), 2000年, 第19巻, 第7号, p.1027~1034(非特許文献8)参照)。これら細胞は、Tリンパ球細胞に対して、さまざまな免疫誘導シグナルを誘導する相互作用分子を提示しており、PD-L1は、PD-1による抑制シグナルを誘導する分子の1つである。PD-L1リガンド刺激は、PD-1を発現しているTリンパ球細胞の活性化(細胞増殖

、各種サイトカイン産生誘導)を抑制することが示されている。さらに、PD-L1の発現は、免疫担当細胞のみでなく、ある種の腫瘍細胞株(単球性白血病由来細胞株、肥満細胞種由来細胞株、肝癌由来細胞株、神経芽細胞種由来細胞株、乳癌由来各種細胞株)でも確認されている(ネイチャー・イムノロジー(Nature Immunology), 2001年, 第2巻, 第3号, p.261~267(非特許文献9)参照)。

PD-L2(EMBL/GenBank Acc. No. NM025239またはNM021896)((ネイチャー・イムノロジー(Nature Immunology), 2001年, 第2巻, 第3号, p.261~267(非特許文献9)は、PD-1の第2番目リガンドとして同定されたが、その発現と機能はPD-L1とほぼ同じであることが報告されている。

#### 【0006】

PD-1に代表される共役抑制分子からの抑制シグナルは、抗原レセプター(TCR)および共役刺激分子によるポジティブなシグナルを適性に制御するメカニズムによって、リンパ球発生ならびに成熟過程での免疫寛容や自己抗原に対する異常な免疫反応を制御していると考えられている。また、ある種の腫瘍やウイルスは、直接的もしくは間接的なメカニズムによって、T細胞の活性化および増殖を遮断し、これら共役抑制分子を自らに対する宿主免疫反応を衰弱させるのに利用していると考えられている(セル(Cell), 1992年, 第71巻, 第7号, p.1093~1102(非特許文献10)、サイエンス(Science), 1993年, 第259巻, 第5093号, p.368~370(非特許文献11)参照)。

#### 【0007】

さらに、T細胞の機能障害に起因すると考えられている疾患の一部では、これら共役抑制分子の異常がT細胞の機能障害を起していると考えられている。これらのことから、癌、感染症またはT細胞機能障害に起因する疾患の治療において、これら共役抑制分子の制御によるTリンパ球細胞性免疫反応の活性化を利用することができる。

#### 【0008】

##### 【非特許文献1】

Ishida, Y., 外3名, ザ・エンボ・ジャーナル(The EMBO Journal), 19



92年, 第11巻, 第11号, p. 3887~3895

【非特許文献2】

Agata, Y. , 外6名, インターナショナル・イムノロジー(International Immunology), 1996年, 第18巻, 第5号, p. 773~780

【非特許文献3】

Nishimura, H. , 外2名, ジャーナル・エクスペリメンタル・メディスン(Journal of Experimental Medicine), 2000年, 第191巻, 第5号, p. 891~898

【非特許文献4】

Agata, Y. , 外6名, インターナショナル・イムノロジー(International Immunology), 1996年, 第18巻, 第5号, p. 765~772

【非特許文献5】

Nishimura, H. , 外3名, インターナショナル・イムノロジー(International Immunology), 1998年, 第10巻, 第10号, p. 1563~1572

【非特許文献6】

Nishimura, H. , 外4名, イムニティー(Immunity), 1999年, 第11巻, 第2号, p. 141~151

【非特許文献7】

Nishimura, H. , 外10名, サイエンス(Science), 2001年, 第291巻, 第5502号, p. 319~332

【非特許文献8】

Freeman, GJ. , 外18名, ジャーナル・エクスペリメンタル・メディスン(Journal of Experimental Medicine), 2000年, 第19巻, 第7号, p. 1027~1034

【非特許文献9】

Latchman, Y. , 外20名, ネイチャー・イムノロジー(Nature Immunology), 2001年, 第2巻, 第3号, p. 261~267

【非特許文献10】

Chen, L. , 外7名, セル(Cell), 1992年, 第71巻, 第7号, p. 10

93~1102

【非特許文献11】

Sarah, E. , 外2名, サイエンス(Science), 1993年, 第259巻, 第5093号, p. 368~370

【特許文献1】

特開平5-336973号公報

【特許文献2】

特開平7-291996号公報

【0009】

【発明が解決するための課題】

本発明の課題は、PD-1、PD-L1またはPD-L2の機能を阻害することとを特徴とする癌もしくは感染症の治療剤の提供にある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、癌もしくは感染症の免疫療法における新たな標的として、PD-1、PD-L1またはPD-L2に注目して検討し、PD-L1を発現している腫瘍細胞を用いた腫瘍移植マウスを用いて、PD-1、PD-L1またはPD-L2の機能を阻害する物質が、癌の増殖を阻害することを見出した。さらに、PD-1遺伝子欠損マウスを用いた解析から、感染したウイルスの排除にPD-1シグナル、具体的にはPD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2の相互作用が関与していることを見出し、これらの解析結果に基づいて、PD-1、PD-L1あるいはPD-L2の機能を阻害する物質が、癌あるいは感染症に対して治療効果を有することを見出し、本発明を完成した。

【0011】

【発明の構成】

すなわち、本発明は以下の免疫賦活剤、癌の免疫療法剤、感染症治療剤、該治療剤を選別するインビトロスクリーニング方法およびインビボ評価法、該評価に用いられる腫瘍細胞株および腫瘍移植マウス、癌治療のための医薬組成物、感染症治療のための医薬組成物、および免疫反応を活性化させたリンパ球細胞に関する

るものである。

【0012】

本発明は、

PD-1またはPD-L1によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する活性を有する免疫賦活剤、

PD-1とPD-L1との相互作用を選択的に阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤、

PD-1またはPD-L1に結合して、その機能を阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤、

PD-1の細胞内ドメインからの抑制シグナルを阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤、

【0013】

PD-1またはPD-L1の産生を阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤、

ポリペプチド、その誘導体、有機合成化合物、天然物またはポリヌクレオチドから選択される、前項1乃至5記載のいずれかの活性を有する物質を有効成分とする免疫賦活剤、

7. 前項2または3に記載の活性を有するPD-1またはPD-L1に対する抗体、

8. 前項7記載の抗体を有効成分とする前項2または3に記載の免疫賦活剤、

【0014】

癌治療に用いることができる前項6または8に記載の免疫賦活剤、

10. 感染症治療に用いることができる前項6または8に記載の免疫賦活剤、

11. PD-L1を発現する細胞を用いて、前項1乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価して選別することを特徴とする癌もしくは感染症の治療剤候補のインビトロスクリーニング方法、

12. PD-L1を安定に発現するように形質転換された前項11に記載のスクリーニング方法で使用する腫瘍細胞株、

【0015】

13. PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植し、前項1乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価して選別することを特徴とする癌の治療剤のインビボ評価法、

14. 前項13のインビボ評価法に用いられる、PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植された腫瘍移植マウス、

15. 前項9または10に記載の免疫賦活剤および薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする癌治療または感染症治療用医薬組成物、

16. 前項9記載の免疫賦活剤と、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤およびその他抗癌剤から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療用医薬組成物、

【0016】

17. 前項9記載の免疫賦活剤と、白血球減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤および癌性疼痛治療薬から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療補助用医薬組成物、

18. 前項10記載の免疫賦活剤と、抗HIV剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤および内臓真菌症治療薬から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる感染症治療用医薬組成物、

19. 体外でPD-1の発現を阻害する遺伝子操作を施し、さらに増殖および分化させ、腫瘍、ウイルスまたは病原体に対する免疫反応を活性化させた患者由来のリンパ球細胞に関する。

【0017】

本発明は、PD-1、PD-L1またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする物質が、癌もしくは感染症の治療に有効に使用できることを示すとともに、その治療剤を提供するものである。

【0018】

本発明の治療剤は、PD-1、PD-L1またはPD-L2に結合してその機能を阻害する物質、あるいはPD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2

との相互作用を阻害する物質、またはPD-1の細胞内ドメインであるITIMドメインから発せられる抑制シグナルを直接的あるいは間接的に阻害する物質を有効成分とする治療剤である。さらに、PD-1、PD-L1またはPD-L2分子自身の産生を阻害する物質もこれに含まれる。

#### 【0019】

PD-1、PD-L1またはPD-L2に結合してその機能を阻害する、あるいはPD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2の相互作用を阻害する物質、いわゆるPD-1、PD-L1またはPD-L2阻害物質としては、抗体、ポリペプチドまたはその誘導体、有機合成化合物、天然物などが挙げられる。特に、特異性に優れた物質として抗体が好適である。

#### 【0020】

本発明で使用する抗体は、PD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2の結合によって誘導される抑制シグナルを阻害する活性あるいはPD-1、PD-L1またはPD-L2に結合してその機能を阻害する活性を有する抗体であれば、ポリクローナルまたはモノクローナルもしくは完全型または短縮型（例えば、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv）、ヒト化抗体、キメラ化抗体のいずれのものでもよい。

#### 【0021】

そのような抗体は、ヒトPD-1、ヒトPD-L1またはヒトPD-L2の細胞外領域の部分タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。細胞外領域の部分タンパク質は、公知のタンパク質発現ならびに精製法によって調製することができる。

#### 【0022】

ポリクローナル抗体は、公知の方法によって製造することができる。例えば、抗原タンパク質、あるいはそれとキャリアー蛋白質との混合物で、適当な動物に免疫を行ない、その免疫動物から抗原タンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。用いられる動物としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモットが一般的に挙げられる。抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイント

トアジュバントを抗原タンパク質と共に投与することができる。投与は、通常約2週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうのが一般的である。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された動物の血液、腹水などから採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、E L I S A (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法によって測定することができる。ポリクローナル抗体の分離精製は、例えば、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤を用いた精製法、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法などの免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

#### 【0023】

抗体製剤としては、モノクローナル抗体あるいはその修飾体がより好ましい。

モノクローナル抗体産生細胞の作製は、抗原で免疫された動物から抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、継代培養可能なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製することにより行うことができる。抗原タンパク質の投与は、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に行う。投与には、抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与するのが一般的である。また、“DNA免疫”と呼ばれる方法によっても、動物を免疫することができる。この方法は、免疫動物の後足前脛骨筋にCardiotoxin (蛇毒) を処置し、さらに抗原タンパク質を発現するベクターを導入した後、組織修復の過程でベクターが筋細胞に取りこまれ、タンパク質を発現する現象を利用した方法である (ネイチャー・イムノロジー (Nature Immunology), 2001年, 第2巻, 第3号, p.261～267)。

#### 【0024】

免疫される動物としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモットが可能であるが、マウスおよびラットが主に用いられる。融合操作は、コーラー (Kohler) とミルステイン (Milstein) の方法 (ネイチャー (Nature), 1975年, 第256巻, 第5517号, p.495～497) で実施することができ、融合促進剤としては、

ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが用いられる。骨髓腫細胞としては、P3U1、NS1、SP2/O、AP1などの骨髓腫細胞が挙げられるが、通常P3U1がよく利用される。モノクローナル抗体産生細胞の選別は、例えば、抗原タンパク質を直接あるいは担体と共に吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加することによるELISA法などにより検出して行うことができる。さらに、ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、ELISA法によって測定できる。モノクローナル抗体の分離精製は、上記のポリクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

## 【0025】

$F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 抗体フラグメントは、プロテアーゼ酵素により処理し、場合により還元して得ることができる。

## 【0026】

$F(a b')_2$ 抗体フラグメントは、精製されたモノクローナル抗体をペプシンで完全に消化し、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、プロテインAあるいはプロテインGカラムなどのアフィニティークロマトグラフィーのいずれかの方法により精製することができる。ペプシンの消化時間は、Igサブタイプにより異なるため、適当に調製することが必要である。 $F a b'$ 抗体フラグメントは、調製した $F(a b')_2$ を2-メルカプトエチルアミンで部分還元することによって作製することができる。また、 $F a b$ 抗体フラグメントは、システイン存在下で消化酵素パインで直接消化し、精製して作製することができる。

## 【0027】

また、モノクローナル抗体は、抗体のアミノ酸配列を決定したり、ハイブリドーマから抗体をコードするDNA配列を利用して、遺伝子組換え技術により改良し、改変抗体やハイブリッド抗体を産生させることも可能である。例えば、通常の完全型抗体ではなく単鎖抗体として作製することもできる。 $s c F v$ 抗体 (single chain Fv) は、ジョストらの方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry), 1994年, 第269巻, 第42号, p.26267~26273) により行うことができる。重鎖および軽鎖の可変領域をそれぞれコードするDNA断片を中性アミノ酸 (グリシンあるいはセリン) をコード

するスパーサーで連結し、この融合DNAを含む発現ベクターを適当な宿主細胞で発現させることによって、本来の抗体の特性と親和性を保持する単鎖の抗体を作製することができる。

#### 【0028】

抗体をヒトの治療に用いる場合、その抗体の抗原性を減少させることが不可欠である。患者の抗体に対する免疫反応は、有効な治療期間を短縮させる場合が多く、抗体をヒト化させ、抗体の抗原性を減らす工程が必要である。

#### 【0029】

ヒトの定常領域をコードする遺伝子とのキメラを構築することによって、ヒト化抗体を作製できることが知られている（プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)), 1987年, 第84巻, p.3439~3443、ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology), 1987年, 第139巻, 第1号, p.3521)。ヒトの定常領域のDNA配列は文献に記載されており、その定常領域遺伝子は既知のクローンから容易に入手できる。続いて、抗体の可変領域をコードするDNA配列をヒトの定常領域の配列に融合させる。ヒトの定常領域のアイソタイプは所望のエフェクター機能または抗体依存細胞性細胞毒性における活性によって選択できる。好ましいアイソタイプはIgG1、IgG3およびIgG4である。また、ヒト軽鎖定常領域、 $\kappa$ 鎖または $\lambda$ 鎖のいずれかを用いることができる。このヒト化キメラ抗体は通常の方法によって発現させることができる。

#### 【0030】

ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンの定常領域遺伝子を導入されたマウスを利用して作製することができ、さらに量産することができる。

#### 【0031】

PD-1、PD-L1またはPD-L2を阻害するポリペプチドもしくはその誘導体としては、PD-1、PD-L1またはPD-L2のそれぞれの部分タンパク質であって、抑制シグナルを誘導しないものが挙げられる。PD-1の抑制シグナル誘導には、PD-1自体が抗原提示された抗原レセプター(TCR)の近傍に存在することが不可欠であり、そのためには抗原提示細胞あるいは腫瘍細



胞に存在するPD-L1またはPD-L2との相互作用による拘束が必要であると考えられる。したがって、細胞外ドメインのみであってPD-1と相互作用する部分を有する可溶性PD-L1または可溶性PD-L2は、PD-1の有効な拮抗物質となり、抑制シグナルを阻害すると考えられる。逆に、同様の構造を有し、PD-L1またはPD-L2に相互作用できる可溶性PD-1もまた有効な拮抗物質になり得る。これら可溶性タンパク質は、PD-1、PD-L1またはPD-L2に結合するのに必要十分な細胞外領域を含むものであればよく、公知のタンパク質発現ならびに精製法によって調製することができる。

#### 【0032】

PD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2の相互作用に必須の領域が、連続するポリペプチドのみによって構成されている場合、そのようなポリペプチド断片は、互いの拮抗物質になり得る。さらに、このポリペプチド断片を化学的に修飾された、あるいはポリペプチド断片の立体構造をもとにコンピュータによって設計された分子群から、より強力な活性を有する拮抗物質を同定することが可能となる。また、相互作用領域のタンパク質立体構造解析データをもとにコンピュータによって設計された分子群の中から、拮抗分子をより効率的に選択することもできる。

#### 【0033】

より簡便な方法として、PD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2の相互作用を測定する各種方法によって、その相互作用を阻害する物質を直接スクリーニングすることができる。同様の活性を有する物質は、ペプチド、非ペプチド性化合物、有機合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物、植物抽出物、動物組織抽出物などのライブラリーから同定することが可能である。

#### 【0034】

インビトロスクリーニングは、例えば、免疫沈降法、RIA (Radio Immunoassay) 法、EIA (Enzyme Immunoassay) 法、メンブレインアッセイ法、BIA (Biomolecular Interaction Analysis) コア装置を使用したタンパク質相互作用測定法、FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 原理を利用したタンパク質相互作用測定法、タンパク質アレイを使用したタンパク質相互作用

測定法で行うことができる。一方、細胞を使用する測定方法として、PD-1を発現する細胞傷害性Tリンパ球細胞（CTL）の傷害活性を測定する方法が挙げられる。

#### 【0035】

具体的には、細胞傷害性Tリンパ球の腫瘍細胞に対する傷害活性を測定し、その活性に対する評価薬物の効果を定量するものである。この方法は、PD-1をネイティブに発現している細胞傷害性Tリンパ球細胞（CTL）細胞株（例えば、2C）に、同系マウス由来であってPD-L1あるいはPD-L2をネイティブに発現している、あるいは強制的に発現させた腫瘍細胞を添加し、接触させることによって生じる細胞傷害活性を定量するものである。本法の特徴は、PD-L1あるいはPD-L2を発現していない腫瘍細胞に対する細胞傷害活性に比べ、PD-L1あるいはPD-L2を発現している腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が低く、評価薬物による細胞傷害活性の回復（上昇幅）をより明確に測定できるところにある。評価薬物による細胞傷害性の回復は、本法の特徴とするPD-L1あるいはPD-L2による細胞傷害性の抑制の阻害に相当するものとして評価することができる。さらに、評価薬物による細胞毒性を任意に測定することがより望ましい。使用される腫瘍細胞としては、ネイティブにPD-L1あるいはPD-L2を発現している腫瘍細胞（例えば、P38D1細胞、P815細胞、NB41A3細胞、MDA-231細胞、SKBR-3細胞、MCF-7細胞、BT474細胞、J558L細胞、P3U1細胞、PAI細胞、X63細胞、SP2/0細胞）（ネイチャー・イムノロジー（Nature Immunology），2001年，第2巻，第3号，p.261～267）を用いることができるが、PD-L1あるいはPD-L2を安定的に発現、あるいは誘導発現させるように形質転換させた腫瘍細胞も使用することができる。一方、使用できる細胞傷害性リンパ球は、PD-1を発現しているものであって、腫瘍細胞に対して同系の動物由来の細胞であることが好ましい。

#### 【0036】

さらに、同様の原理を利用したインビボ評価法は、上記PD-L1あるいはPD-L2発現腫瘍細胞を同系マウスに移植して、移植腫瘍の増殖、各種血中サイ

トカイン産生量、腫瘍の浸潤ならびに転移の組織学的解析、個体群の延命効果などを評価することができる。本法も、PD-L1あるいはPD-L2発現腫瘍細胞を使用するところに特徴があり、上記インビトロ法と同様の効果を利用したものである。本法における評価薬物による腫瘍の治療効果は、PD-L1あるいはPD-L2による細胞傷害性の抑制の阻害に由来する効果に相当するものとして評価することができる。移植する腫瘍細胞は、インビトロスクリーニング法で利用できる腫瘍細胞のいずれをも使用できるが、移植マウスと同系由来のもので、増殖性が良いものがより好ましい。

#### 【0037】

PD-1の細胞内ドメインの抑制シグナルを阻害する物質としては、ペプチドもしくはペプチド類縁体、有機合成化合物、天然物が挙げられる。PD-1によるTリンパ球細胞の活性化の抑制は、PD-1の細胞内ドメインであるITIMに結合した脱リン酸化酵素が、抗原レセプター（TCR）の細胞内複合体に接触することによって生じることから、総じて、抗原レセプターとPD-1の接触を阻害するものがこれに相当すると考えられる。よって、抑制シグナルを阻害する物質として、ITIMのチロシン残基のリン酸化を阻害するもの、ITIMへの脱リン酸化酵素の結合を阻害するもの、その脱リン酸化酵素の活性を直接阻害するものなどが含まれる。

#### 【0038】

PD-1、PD-L1またはPD-L2の産生を阻害する物質としては、ポリヌクレオチドまたは有機合成化合物もしくは天然物が挙げられる。特に、好適なポリヌクレオチドとして、リボザイムと呼ばれるアンチセンスヌクレオチド誘導体が挙げられる。これは、PD-1、PD-L1またはPD-L2のmRNAに相補的なポリヌクレオチド誘導体を、対応する発現細胞に導入することによって、発現するmRNAが破壊される機構を利用したものである。さらに、ベクターは、患者から採取したリンパ球前駆細胞に対して、PD-1の発現を阻害するような遺伝子治療的操作を施し、成熟化および活性化させて、再び患者に投与する細胞医療に利用することができる。癌に対する免疫療法においては、リンパ球前駆細胞の成熟化および活性化の際に、腫瘍抗原を添加することによって、腫瘍に

特異的で、よりクローナルなリンパ球細胞を調製することができる。

【0039】

本発明の治療剤は、PD-1、PD-L1またはPD-L2の機能を阻害する物質やPD-1の細胞内ドメインであるITIMドメインから発せられる抑制シグナルを直接的あるいは間接的に阻害する活性を有する物質、さらに、PD-1、PD-L1またはPD-L2分子自身の産生を阻害する活性を有する物質を有効成分とする治療剤である。癌治療あるいは感染症においては、これら阻害活性を有する治療剤は、Tリンパ球細胞の免疫反応を活性化させることによって、抗腫瘍免疫あるいは抗ウイルス活性等を賦活させることができる。

【0040】

本発明者らは、腫瘍移植動物モデルへの投与によって、腫瘍の増殖を顕著に抑制し個体の延命効果を発揮する治療剤として、PD-L1の機能を阻害する特異的抗体（抗PD-L1抗体）を開発した。この抗体は、PD-1を発現しているCTL（細胞傷害性Tリンパ球細胞）へのPD-L1リガンドの提示によって相対的に低下する細胞傷害活性を回復させる作用を示した（実施例1，図1参照）。これは、CTLによる腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が、この抗体の投与によって増強しうることを示唆するものである。さらに、この抗体の投与は、PD-L1を人為的に発現させた肥満細胞腫由来細胞株を移入した同系マウスを用いた腫瘍移植動物モデル（蛋白質・核酸・酵素、1981年、26巻、3号、p.208～224）において、腫瘍増殖や腫瘍細胞の浸潤および転移を抑制し、個体の延命効果を示した（実施例2の図2、実施例3の図3参照）。この抗体によるPD-L1機能の阻害による効果と同様の効果が、PD-1の機能あるいは産生を阻害することによって得られることが示唆された。これは、PD-1欠損マウスを用いた腫瘍移入モデルでは、移入腫瘍細胞の増殖が全く認められなかったからであり、PD-1の機能阻害あるいは産生阻害も有効な癌治療方法になることを示すものである（実施例5，図5参照）。

【0041】

さらに、発明者らは、PD-1、PD-L1またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する物質を有効成分とする治療剤が、感染症治療に

有用であることを示した（実施例11，図11，12参照）。

【0042】

本発明者らが実験的に示したこれら結果は、抗PD-L1抗体のみが既述の効果を呈することを示すものではなく、PD-1、PD-L1またはPD-L2からの抑制性シグナルの誘導を阻害し得るいずれの物質もほぼ同様の効果を呈することを証明するものである。そのような効果を有する物質として、抗PD-1阻害抗体または抗PD-L2阻害抗体、可溶化PD-1、可溶化PD-L1または可溶化PD-L2、PD-1拮抗物質、PD-L1拮抗物質またはPD-L2拮抗物質、PD-1とPD-L1あるいはPD-1とPD-L2の相互作用を阻害する物質、PD-1産生阻害物質、PD-L1産生阻害物質またはPD-L2産生阻害物質、PD-1による細胞内抑制シグナル阻害物質などが挙げられる。

【0043】

本発明の治療剤の投与によって、その効果が期待される腫瘍細胞は、癌腫、扁平上皮癌（例えば、子宮頸管、喉、結膜、陰肺、口腔、皮膚、膀胱、舌、喉頭、食道）、腺癌（例えば、前立腺、小腸、子宮内膜、子宮頸管、大腸、肺、脾、食道、直腸、子宮、胃、乳房、卵巣）が挙げられる。さらに、肉腫（例えば、筋原性肉腫）、白血病、神経腫、メラノーマ、リンパ腫なども含まれる。

【0044】

これら腫瘍細胞のうち、特にPD-L1あるいはPD-L2を顕著に発現している腫瘍細胞に対してその効果が期待できる。PD-L1あるいはPD-L2の発現を、外科的に切除した腫瘍塊あるいは体外に採取した病変部の腫瘍片をサンプルとする検査により同定することができた場合、本発明の薬剤の投与は、PD-L1あるいはPD-L2を顕著に発現している腫瘍を有する患者に対する外科的処置後の治療として、効率的で有効な方法となる。

【0045】

癌に対する化学療法および放射線療法は、リンパ球の増殖を激しく減少させるという副作用が不可避である。本発明の薬剤の投与は、減少したリンパ球細胞を刺激、増殖させる効果を示すと共に、通常の化学療法に付随する激しい副作用を最小限に抑制することができる。同様なことが放射線療法にも言える。本発明の

薬剤との併用によって、化学療法剤の用量または照射放射線量を、通常使用される用量あるいは照射量から大幅に減少させることができる。

## 【0046】

本発明の治療剤は、既存の化学療法剤と併用、あるいは合剤化することができる。そのような化学療法剤として、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤、その他の抗癌剤が挙げられる。さらに、患者のQOL回復のための癌治療補助剤である白血球（好中球）減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤、癌性疼痛治療薬と併用あるいは合剤化ができる。

## 【0047】

本発明の治療剤は、その他の免疫賦活剤と併用、あるいは合剤化することができる。そのような免疫賦活剤としては、各種サイトカインや腫瘍抗原などが挙げられる。免疫反応を刺激するサイトカインとしては、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-12などが挙げられる。また、B7リガンド誘導体、抗CD3抗体および抗CD28抗体、抗CTLA-4抗体も免疫反応を高めることができる。

## 【0048】

腫瘍抗原の投与も、腫瘍細胞に対するTリンパ球細胞の特異的免疫反応を高めることができ、本発明の薬剤との併用によって、付加的あるいは相乗的な増強を与えることができる。腫瘍抗原は、遺伝子が明らかなものについては精製タンパク質として、また不明なものについては、腫瘍細胞自体の溶解物として調製することができる。

## 【0049】

腫瘍抗原の例として、悪性黒色腫のMAGE-1、MAGE-3由来のHLA-A1およびHLA-A2拘束ペプチドやMART-1、gp100などが挙げられる。また、乳癌や卵巣癌のHER2/neuペプチドや腺癌のMUC-1ペプチド、さらに、転移性癌のNY-ESO-1などが挙げられる。

## 【0050】

ウイルスは、感染宿主の免疫防御から逃れるための1つの方法として、Tリンパ球細胞の共役抑制因子を利用していると考えられている（ジャーナル・エクスペリメンタル・メディシン(Journal Experimental Medicine), 2000年, 第191巻, 第11号, p.1987~1997)。ウイルス感染の慢性化は、このようなウイルスのエスケープ機能に一部起因しており、本発明の治療剤の投与によってTリンパ球細胞のウイルスに対する免疫反応を高めることができると考えられる。

#### 【0051】

本発明の治療剤の投与は、高い罹患率と早期の死亡を伴う感染症であるヒト肝炎ウイルス（B型肝炎（HBV）およびC型肝炎（HCV））やヒトレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV1およびHIV2）、ならびにT細胞白血病およびヒトTリンパ向性ウイルス（HTLV1およびHTLV2）の治療に有効である。また、単純ヘルペスウイルス（HSV）1型および2型、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、水痘-帯状疱疹ウイルス（VZV）およびヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）を含むヒトヘルペスウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、おたふくウイルス、インフルエンザウイルス、風邪ウイルスとして挙げられるアデノウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルスなどの感染の治療にも有効であると考えられる。

#### 【0052】

その他の病原体（例えば、病原性原生動物（トリパノソーマ、マラリアおよびトキソプラズマ）、細菌（マイコバクテリウム、サルモネラおよびリステリア）および真菌（カンジダ））による感染に対しても有効であると考えられる。

#### 【0053】

本発明の治療剤は、既存の抗HIV剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤、内臓真菌症治療薬と併用あるいは合剤化することができる。

#### 【0054】

抗HIV剤としては、逆転写酵素阻害剤（例えば、AZT, ddI, 3TC, ddT）やプロテアーゼ阻害剤（例えば、メシル酸サキナビル、リトナビル、メシル酸ネルフィナビル、アンブレナビル、メシル酸デラビルジン、サキナビル、

ロピナビル／リトナビル)、CCR5受容体拮抗剤などが挙げられる。抗ウイルス剤としては、抗ヘルペスウイルス剤、抗インフルエンザウイルス剤、インターフェロン- $\alpha$ および $\beta$ 、各種免疫グロブリンが挙げられる。

#### 【0055】

本発明の治療剤は、ウイルスもしくは病原体のワクチンと併用あるいは共に製剤化することができる。そのようなワクチンとしては、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、日本脳炎ワクチン、BCGワクチン、3種混合ワクチン、おたふくワクチン、水痘ワクチン、インフルエンザワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、コレラワクチンが挙げられる。

#### 【0056】

##### 【医薬品への適用】

本発明の治療剤を上記の目的で用いるには、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

#### 【0057】

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、1回につき、 $1\mu\text{g}$ から $1000\mu\text{g}$ の範囲で、1日1回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、1回につき、 $1\mu\text{g}$ から $300\mu\text{g}$ の範囲で、1日1回から数回非経口投与（好ましくは、静脈内投与）されるか、または1日1時間から24時間の範囲で静脈内に持続投与される。

#### 【0058】

もちろん前記したように、投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

#### 【0059】

本発明の治療剤を投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤、および非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

#### 【0060】

経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれ



る。

#### 【0061】

このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質がそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

#### 【0062】

経口投与のための内服用液剤は、薬剂的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

#### 【0063】

非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造

し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

#### 【0064】

非経口投与のためのその他の製剤としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、軟膏剤、塗布剤、吸入剤、スプレー剤、坐剤および腔内投与のためのペッサリー等が含まれる。

スプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば、米国特許第2868691号明細書および米国特許第3095355号明細書に詳しく記載されている。

#### 【0065】

##### 【発明の効果】

PD-1、PD-L1またはPD-L2の機能を阻害することを特徴とする治療剤に、癌もしくは感染症に対する新たな治療効果を見出した。

#### 【0066】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

#### 【0067】

##### 実施例1

マウスPD-L1発現ベクターの作製は、マウスPD-L1 cDNA (ジャーナル・エクスperimental・メディスン(Journal of Experimental Medicine), 2000年, 第19巻, 第7号, p.1027~1034) を制限酵素EcoRIで消化して、発現ベクターpApuroXS (ザ・エンボ・ジャーナル(The EMBO Journal), 1994年, 第13巻, 第6号, p.1341~1349) に挿入し、連結させることによって行った。作製した発現ベクターpApuroXS-PD-L1のP815細胞への導入は、エレクトロポレーション法(360V、500 $\mu$ F)で行った。P815細胞の培養は、FCS(10%)、2-メルカプトエタノール( $10^{-5}$ M)、

各種抗生物質含RPMI-1640培地で培養できるが、さらに、抗生物質ピュロマイシン (Puromycin;  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含んだ培地の培養に対して耐性の同細胞株を継代培養することによって、マウスPD-L1を安定的に発現する形質転換P815細胞株を取得した。PD-L1の発現は、フローサイトメトリー解析にて確認した。図1(A)にH-2L<sup>d</sup>特異的2C CTLクローンのPD-L1発現(i)と、P815(肥満細胞種由来細胞株)のPD-L1発現安定形質転換株でのPD-L1発現(ii)を示すフローサイトメトリーを示す。

## 【0068】

同様の方法で、PD-L1を安定的に発現する形質転換B16細胞株(B16/PD-L1)を取得した(図1(A)(iii)~(v)参照)。ここでは発現ベクターとして同様の方法で作製したpEFBOSneo-PD-L1(ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acid Research), 1990年, 第18巻, 第17号, p.5322)を用い、細胞株の選択培養にはG418( $0.5\text{mg}/\text{ml}$ )を使用した。

## 【0069】

全長マウスPD-L1 cDNAの3'末端側に6個のヒスチジンがタンデムに並んだペプチドタグ(His-Tag)を連結させたタンパク質をコードするcDNAを制限酵素EcoRIおよびNotIで消化して、発現ベクターpVL1393(商品名: Clontechより購入)に挿入させた。続いて、この発現ベクターをSF9昆虫細胞(Invitrogenより購入)に導入して、封入体を回収した。この封入体ウイルスをHiFive昆虫細胞(Invitrogenより購入)に2日間、27℃下で培養することによって感染させた。溶解緩衝液(Tris-HCl(50 mM, pH7, 含1% TritonX-100)、EDTA(10 mM)、NaCl(150 mM)、各種プロテアーゼ阻害剤)で溶解させた細胞溶解液を、Ni-セファロースカラムクロマトグラフィーで処理することによって、抗原となる精製PD-L1タンパク質を取得した。

## 【0070】

透析した同PD-L1タンパク質を完全フロイントアジュバンドと共に8週令メスWhisterラット(SLC Japanより購入)に免疫して、数日後、末梢リンパ節か

ら回収した $2 \times 10^8$ 細胞を、PEG1500 (Amershamより購入) を用いて同数のSP2/0細胞と細胞融合させた。さらに、RPMI1640培地 (HAT (Sigmaより購入)、Origen (10%, Igenより購入)、FCS (10%)、2-メルカプトエタノール ( $10^{-5}$ M)、各種抗生物質) で培養することによって選択し、産生抗体の存在をフローサイトメトリー解析にて確認した。これによって樹立されたハイブリドーマ (識別のための表示: 1-111、受託番号: FERMP-18908) をBalb/C nu/nuマウスに移入して、後に腹水からの回収液をプロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーで精製することによって、PD-L1に対するモノクローナル抗体1-111Aを取得した。フローサイトメトリー等で使用される抗体は、Sulfo-NHS-LC-biotin (商品名: Pierceより購入) を用いてビオチン化したものを用いた。

#### 【0071】

細胞傷害性アッセイは、 $^{51}\text{Cr}$  (クロム) 遊離アッセイによって行った。

2C細胞 (ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology), 1996年, 第157巻, 第2号, p.670~678) は、2CトランスジェニックB6マウス由来の(H-2L)<sup>d</sup>アロ反応性の細胞傷害性T細胞である。図1(B)に、2C細胞(E:エフェクター)を $^{51}\text{Cr}$ ラベル化したP815細胞(T:ターゲット)と共に(○)または3つのPD-L1発現P815細胞株(P815/PD-L1) (□、◇、△)と共にあるいはさらに10mg/mlラットanti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>IgG存在下(▲)を、さまざまなE/T比で混合して、4時間で遊離される $^{51}\text{Cr}$ を測定した結果を示す。

#### 【0072】

抗PD-L1抗体(anti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>)は、細胞傷害性Tリンパ球細胞の低下した細胞傷害活性を回復させた。これらの結果から、PD-L1の機能を阻害することによるPD-1およびPD-L1シグナルの阻害は、癌細胞に対する細胞傷害活性を増強させることができると考えられる。

#### 【0073】

#### 実施例2

$1 \times 10^6$ 細胞のP815細胞(n=6)またはP815/PD-L1細胞(

n = 6) を同系DBA/2マウスの皮下にそれぞれ移入し、腫瘍増殖とマウスの生存率を評価した。その結果を図2 (A) に示す。図中、○はP815細胞株移植群、□、△はPD-L1発現P815細胞株移植群である。さらにP815/PD-L1細胞を移入した群の組織学的解析を行った。移入20日後のマウスの腹壁ならびに腹膜腔の組織切片を、10%ホルムアルデヒドで固定、パラフィンで砲架して、ヘマトキシリン、エオジンで染色して得られた染色像を図2 (B) に示す。図中、aは腹壁および腹膜への腫瘍細胞の浸潤を示す40倍像、bは同じく400倍像であり、cは脾臓への転移、dは肝臓への転移を示す。

#### 【0074】

P815細胞を移植した群では、P815細胞の増殖は抑えられており、6～7週目では30%が生存したのに対して、PD-L1を発現するP815細胞 (P815/PD-L1) を移植した群では、癌細胞の増殖は著しく、2～4週目までに全例が死亡した (図2 (A))。P815/PD-L1は、腹膜腔、さらに、腹腔へ浸潤しており、また、肝および脾臓への転移が認められた (図2 (B) a～d参照)。

#### 【0075】

#### 実施例3

P815細胞を移入し免疫したマウスから細胞傷害性T細胞CTLを調整し、 $2 \times 10^6$ 個数のCTL細胞と、 $5 \times 10^6$ 個数のP815細胞またはP815/PD-L1細胞のみ、あるいはanti-PD-L1 F(ab')<sub>2</sub> IgG (10 mg/ml) 存在下でP815/PD-L1細胞をそれぞれ混合培養し、24時間後の培養上清中のIFN- $\gamma$ をELISAキット (Bioscienceから購入) で測定した。その結果を図3 (A) に示す。

また、図3 (B) に、 $3 \times 10^6$ 個数のP815/PD-L1細胞を皮下移入した同系DBA/2マウス (n = 10) に、ラットIgG (□) あるいはanti-PD-L1 F(ab')<sub>2</sub> IgG (0.1 mg/一匹) (○) を、細胞移入後1、3、5、7日後にそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍増殖とマウスの生存率を評価した結果を示す。

抗PD-L1抗体は、P815/PD-L1により抑制された細胞傷害性Tリ

ンパ球細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を回復させた(図3(A))。抗PD-L1抗体の投与は、癌細胞増殖を抑制し、明確な生存効果を示した(図3(B))。この結果は、抗PD-L1抗体の投与が癌治療に有効であることを示している。

【0076】

#### 実施例4

$1 \times 10^6$ 個数のB16メラノーマ( $n=6$ )またはB16/PD-L1細胞( $n=6$ )をB6マウスにはそれぞれ皮下移入し、同数のB16/PD-L1細胞をPD-1トランスジェニックB6マウス( $n=5$ )およびPD-1遺伝子ホモ欠損B6マウス(PD-1 $^{-/-}$  ( $n=4$ )) (サイエンス(Science), 2001年, 291巻, 5502号, p.319~332)に移入し、以後25日までそれぞれの腫瘍増殖を測定した。その結果を図4に示す。

【0077】

#### 実施例5

$2.5 \times 10^8$ 個数のJ558Lミエローマ細胞を皮下移入した同系Balb/Cマウス( $n=9$ )に、ラットIgGあるいはanti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>IgG(0.1mg/一匹)を細胞移入後3、5、7日後にそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍増殖を評価した(図5(B))。また、同様にJ558Lミエローマ細胞を皮下移入したPD-1ホモ欠損マウスとBalb/C( $n=4$ )での腫瘍増殖を比較した(図5(C))。

抗PD-L1抗体の投与は、PD-L1を発現しているJ558癌細胞(図5(A)に各種ミエローマ細胞株でのPD-L1発現を示すフローサイトメトリーを示す。)の増殖を抑制した(図5(B))。また、J558細胞を移植したPD-1欠損マウスでは移植癌細胞の増殖は完全に阻害された(図5(C))。これらの結果は、PD-L1もしくはPD-1の阻害が癌治療に有効であることを示している。

【0078】

#### 実施例6

血管内皮細胞(以下、ECsと略す。)をマレリーバーグの方法(ジャーナル・イムノロジー・メソッズ(Journal Immunology Methods), 2000年, 第244巻,

第1-2号, p.205~215) により、マウス心臓から取得した。具体的には、心臓組織をコラゲナーゼで消化した後、マウスIgとともに前培養、さらに、FITC修飾した抗CD31抗体、同修飾抗CD105抗体、同修飾抗isolectinB4抗体、および、抗FITCビーズを添加して培養した。この血管内皮細胞をMagnetic-activated cell-sorting separation columns (商品名: Miltenyi Biotecより購入) を用いて、ポジティブ選択によって精製した。

取得した血管内皮細胞でのPD-L1、PD-L2の発現を、フローサイトメトリーで確認した。同細胞の標識には、抗PD-L1抗体(抗体名: 1-111 ハイブリドーマ受託番号: FERM P-18908)、抗PD-L2抗体(抗体名: #122) および蛍光標識した2次抗体を用いて行った(図6(A))。解析はCellQuestソフトウェア(Dickinsonより購入)を使用したFacsCalibur(機器名: Becton Dickinsonより購入)で、1万回イベントで解析した。PD-L1あるいはPD-L2の発現は、開口曲線で示され、コントロールIgは充填曲線で示される。

マウス各組織でのPD-L1発現の確認を組織染色によって行った。各組織サンプリング1時間前に100 $\mu$ gビオチン標識化抗PD-L1抗体(1-111)を溶解した100 $\mu$ lPBSをマウスに静脈投与した。続いて、5 $\mu$ m凍結切片を4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定して、Streptavidin-FITCで染色した。さらに、各切片をPhalloidinで対比染色した(図6(B))、(a)眼球、(b)顎下腺、(c)心臓、(d)肺、(e)肝臓、(f)腎臓でのPD-L1の発現を示す。図中、Chは脈絡膜、CVは中心静脈、Glは糸球体、Reは網膜を示す。各矢印は、血管内皮細胞を示す。各染色像は40倍拡大像である。)。PD-L1は、心臓、肺、腎臓、胃、小腸、顎下腺、眼球、肝臓の血管内皮で認められた。肝臓での発現は、肝臓洞様毛細血管に局在していた。

【0079】

#### 実施例7

肝臓非実質細胞(以下、LNPCsと略記する。)でのPD-L1発現を組織染色(図7(A))ならびにフローサイトメトリー(図7(B))で確認した。組織染色は、3%PFAで固定した5 $\mu$ m肝臓凍結切片をラット血清で前処理し

、ビオチン標識化抗PD-L1抗体(1-111)あるいはビオチン標識化抗ICAM-1抗体(商品名:BD Pharmingenより購入)にて1時間、室温下で抗体反応を行い、ビオチン抗体をtyramide signal amplification (TSA) fluorescence system (機器名:PerkinElmer Life Sciencesより購入)にて視覚化した(図7(A)、左図:ICAM-1の発現、右図:PD-L1の発現、CV:中心静脈を示す。各染色像は40倍拡大像である。)

LNPCsは、pronase E法(エクスペリメンタル・セル・リサーチ(Experimental Cell Research), 1976年, 第99巻, p.444~449)によってマウス肝臓より単離した。具体的には、LNPCsは、肝臓をpronase E溶液(Merck)にて還流、培養し、密度勾配遠心法にて分離した。その細胞懸濁液中のクップファー細胞(Kupffer cells) ( $CD54^+$ ,  $CD11b^{high}$ )の相対的分布は20~25%であり、肝臓類洞周囲腔内皮細胞(以下、LSECsと略記する。)( $CD54^+$ ,  $CD11b^{high}$ )は、75~80%である。

クップファー細胞とLSECsを、FITC標識化抗CD11b抗体およびICAM-1、PD-L1、B7-1、B7-2に対するそれぞれのビオチン化モノクローナル抗体、それに続くPE標識化Streptavidinにて、それぞれ二重染色した。クップファー細胞とLSECsは、それぞれ $CD11b^{high}$ と $CD11b^{low}$ 細胞としてゲートされる(図7(B))。

PD-L1は、クップファー細胞では、ICAM-1、B7-1、B7-2を共発現しているが、LSECsではその発現は弱いものであった(図7(B))

【0080】

#### 実施例8

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス( $PD-1^{-/-}$ )あるいは野生型C57BL/6マウス(wt)の脾臓ならびにリンパ組織から、T-cell enrichment column(商品名:Genzymeより購入)を用いたネガティブ選別によって、ナイーブT細胞(精製度90%以上)を精製した。同細胞を $10 \mu g/ml$ 抗CD3モノクローナル抗体(2C11)とともに48時間培養して活性化させた。

上記方法によって活性化したナイーブT細胞を、FITC標識化抗CD4抗体



あるいはAPC標識化抗CD8抗体ならびにPE標識化抗CD25抗体、PE標識化抗CD44抗体、PE標識化抗CD69抗体、PE標識化抗CTLA-4抗体、ビオチン標識化抗B7-1 (CD80) 抗体、ビオチン標識化抗B7-2 (CD86) 抗体、抗PD-1抗体 (J43)、抗PD-L1抗体 (1-111) で二重染色して、フローサイトメトリーにてそれぞれの分子の発現を解析した (図8)。

【0081】

#### 実施例9

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス (PD-1<sup>-/-</sup>) あるいは野生型マウス (wt) のナイーブT細胞の活性化は、上記実施例8に記載の方法で行った。活性化後の同細胞の増殖をBrdU取りこみ法によって測定した (図9 (a))。BrdUを48時間の最後の6時間に添加して細胞を標識し、これをProliferation ELISA kit (商品名: Rocheより購入) を用いる測定によって細胞増殖を決定した。また、この時のIFN- $\gamma$ 産生量をELISA kit (商品名: Genzymeより購入) にて測定した (図9 (d))。

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス (PD-1<sup>-/-</sup>) あるいは野生型マウス (wt) 由来のT細胞を上記実施例8に記載の方法であらかじめ活性化させた。続いて、既に活性化しているT細胞に対して、野生型マウスからのマイトマイシンC処理LNPCsの存在あるいは非存在下で、さらに、30  $\mu$ g/ml抗PD-L1抗体 (1-111) (コントロールとしたラットIgG)、20  $\mu$ g/ml CTLA4-Ig (Genzyme) (コントロールとしたヒトIgG) の存在あるいは非存在下でそれぞれ60時間培養して、最後の12時間の同細胞の増殖をBrdU取りこみ法によって測定した (図9 (b))。また、48時間時点でのIFN- $\gamma$ 産生量も測定した (図9 (e))。

ナイーブT細胞の活性化時におけるIFN- $\gamma$ 産生量は、PD-1<sup>-/-</sup>と野生型マウスの違いによる有意な差異は認められなかった。一方、既に活性化されたT細胞においては、野生型マウス由来のT細胞のIFN- $\gamma$ 産生量は、PD-1<sup>-/-</sup>由来のものに比べ有意に低かった (図9 (d)、(e))。このことから、既に活性化しているT細胞に対するPD-1の抑制作用の効果は、ナイーブT細

胞の活性化に対する効果よりも高いことが示唆された。

野生型マウス由来の活性化したT細胞は、LNPCsとの共培養では、T細胞の細胞増殖およびIFN- $\gamma$ 産生量に有意な変化は認められないが、PD-1<sup>-/-</sup>由来の活性化したT細胞は、LNPCsとの共培養によって、その細胞増殖に有意な増加が認められた(図9(b)、(e))。また、野生型マウス由来の活性化したT細胞とLNPCsとの共培養への抗PD-L1抗体の添加によって、T細胞の細胞増殖の増加が認められた(図9(b))。これらの結果は、LNPCsのPD-1あるいはPD-L1が、活性化T細胞の抑制に関与しており、PD-1の欠如あるいはPD-1とPD-L1間の相互作用の阻害が、T細胞を活性化することを示すものである。

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)の活性化T細胞を、5  $\mu$ M CFSE (5-(6)-carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl diester) (商品名: Molecular probesより購入) で標識して、LNPCsとともに48時間共培養した。この時の細胞分裂を、FACSを用いたCFSE活性測定によって決定した(図9(c))。

活性化T細胞の細胞増殖抑制は、細胞分裂の停止に起因しており、PD-1シグナルがT細胞の細胞分裂を抑制することが示唆された(図9(c))。

【0082】

#### 実施例10

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)(3匹/群)に $10^9$ – $10^{10}$  PFU (plaque-forming units) Ad-lacZを静脈内投与して、マウスをアデノウイルスに感染させた。ここで使用したAd-lacZは、E1およびE3領域に欠損を有し、さらに、lacZ遺伝子を持った5型アデノウイルスであり、293細胞で増殖させた後、塩化セシウム密度勾配遠心分離(ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acid Research), 1995年, 第234巻, 第19号, p.3816~3821)の記載によって精製したものである。

感染後0日目あるいは7日目に、同マウスに対して屠殺1時間前に0.5mg BrdU (商品名: Sigmaより購入) を静脈内投与して、採取した脾臓細胞および

肝臓内リンパ球を抗BrdU抗体および抗CD19抗体あるいは抗CD3抗体で二重標識した(図10(a)、(b))。

さらに、感染後7日目の同細胞に対しては、抗BrdU抗体、抗CD19抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体で二重標識した(図10(c)、それぞれの棒グラフはBrdU陽性細胞の割合を示す。)

アデノウイルス感染したPD-1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓では、同様に感染した野生型マウスの肝臓に比較して、増殖性(BrdU陽性)の各リンパ球(CD19陽性、CD3陽性、CD4陽性、CD8陽性)の割合が増加していた。一方、このような現象が脾臓では認められなかったことから、PD-1は、炎症を起した組織でのT細胞の増殖を阻害することが示唆された(図10(c))。

【0083】

#### 実施例11

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)(3匹/群)に $10^9-10^{10}$ PFU Ad-1acZを静脈内投与して、マウスをアデノウイルスに感染させ、さらに、感染後0日目あるいは7日目の屠殺1時間前に0.5mg BrdU(商品名:Sigmaより購入)を静脈内投与して、採取した肝臓切片を抗BrdU抗体で標識した(図11(a)~(d))、20倍拡大像)。感染後7日目のPD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)の肝臓切片に対しては、抗BrdU抗体および抗CD4抗体あるいは抗CD8抗体で二重標識した(図11(e)、(f)、40倍拡大像)。

感染後30日目の野生型マウスの肝臓では、洞様毛細血管および非実質領域への中程度の局所的な細胞浸潤が認められたが、PD-1<sup>-/-</sup>マウスでは、肝炎を示す症状は認められなかった(図12(h)、(i)および(j)、(n))。

感染後7日目あるいは30日目のPD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)の肝臓切片に対して、ヘマトキシリン&エオジン染色(図12(g)~(j)、20倍拡大像、(k)~(n)、40倍拡大像)およびX-Gal染色を行った(図12(o)~(r)、40倍拡大像)。

感染後7日目および30日目の野生型マウスの肝臓では、X-Gal染色像が示すアデノウイルスの感染が認められたが、PD-1<sup>-/-</sup>マウスでは、その感染

は、30日目にはほぼ排除されていた（図12（o）、（p）および（q）、（r））。これらの結果から、PD-1シグナルが、ウイルス感染による炎症組織におけるエフェクターT細胞の細胞増殖を誘導することによるウイルスの排除に関与することが示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】 （A）はH-2L<sup>d</sup>特異的2C CTLクローンのPD-1発現と、P815（肥満細胞種由来細胞株）のPD-L1発現安定形質転換株でのPD-L1発現を示すフローサイトメトリー、（B）はPD-L1発現P815細胞株に対する2C CTL細胞株の細胞傷害活性と抗PD-L1抗体（anti-PD-L1 F（a b'）<sub>2</sub> IgG）の細胞傷害活性に対する効果を示す。

【図2】 同系マウスにおける移植PD-L1発現P815細胞株の腫瘍増殖性と浸潤性を示す。（A）は移植PD-L1発現P815腫瘍の腫瘍容積（上）、移植後の生存率（下）であり、（B）は同系DBA/2マウスにおける移植PD-L1発現P815腫瘍塊の組織染色像である（aは腹壁および腹膜への腫瘍細胞の浸潤を示す40倍像、bは同じく400倍像、cは脾臓への転移、dは肝臓への転移を示す。）。

【図3】 同系マウスにおける移植PD-L1発現P815細胞株の腫瘍増殖性に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果を示す。（A）は当該マウスにおける腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果、（B）は当該マウスにおける移植PD-L1発現P815腫瘍の腫瘍容積（上）と生存率（下）に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果を示す（図中、□は対照群（ラットIgG投与群）、○は抗PD-L1抗体（anti-PD-L1 F（a b'）<sub>2</sub> IgG）投与群）。

【図4】 PD-1遺伝子ホモ欠損同系マウス（PD-1<sup>-/-</sup>）でのPD-L1発現B16メラノーマの増殖抑制を示す。

【図5】 同系マウス（BALB/c）における移植ミエローマ細胞株の腫瘍増殖性に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果とPD-1の関与を示す。（A）は各種ミエローマ細胞株でのPD-L1発現を示すフローサイトメトリー、（B）は前記マウスにおける移植J558L腫瘍の腫瘍容積に対する抗PD-L

1 抗体のin vivo効果、(C)は野生型およびPD-1遺伝子欠損PD-1<sup>-/-</sup>の同系マウスにおける移植J558L腫瘍の腫瘍増殖の比較を示す。

【図6】 血管内皮でのPD-L1発現を示す。(A)はマウス心臓の血管内皮細胞でのPD-L1, PD-L2の発現を示す。(B)はマウス各組織でのPD-L1発現の確認を組織染色を示す。(a):眼球、(b):顎下腺、(c):心臓、(d):肺、(e):肝臓、(f):腎臓でのPD-L1の発現を示す。図中、Chは脈絡膜、CVは中心静脈、Glは糸球体、Reは網膜を示す。各矢印は、血管内皮細胞を示す。各染色像は40倍拡大像である。

【図7】 肝臓非実質細胞でのPD-L1発現を示す。(A)はマウス肝臓でのICAM-1およびPD-L1の発現を示す(CV:中心静脈)。(B)はクップファー細胞(Kupffer cell)および肝臓類洞周囲腔内皮細胞(LSEC)での細胞表面分子のフェノタイプを示す。

【図8】 PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)の活性化T細胞での細胞表面分子のフェノタイプを示す。

【図9】 T細胞増殖ならびにサイトカイン産生に対するLNPCのPD-L1の効果を示す。(a)、(d)はPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスのナイーブT細胞刺激時の細胞増殖とIFN- $\gamma$ 産生をそれぞれ示す。(b)、(e)はPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウス由来で既に活性化されたT細胞とLNPCとの共培養における細胞増殖、その細胞増殖に対する抗PD-L1抗体の効果およびIFN- $\gamma$ 産生をそれぞれ示す。(c)はLNPCとの共培養におけるPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスからの活性化T細胞の細胞分裂を示す。

【図10】 ウイルス感染したマウス肝臓におけるTリンパ球細胞の増殖に対するPD-1の関与を示す。(a)、(b)は、アデノウイルス感染後0日および7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスの肝臓でのリンパ球細胞の増殖をそれぞれ示す。(c)は、感染後7日目での各種リンパ球の割合を示す。

【図11】 ウイルス感染に対するPD-1の関与を示す。図中(a)~(d)は、アデノウイルス感染後0日および7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスの肝臓でのそれぞれの細胞増殖を示す組織染色像である。(e)、(f)はアデノウイルス感染後7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスでのCD4陽性、CD

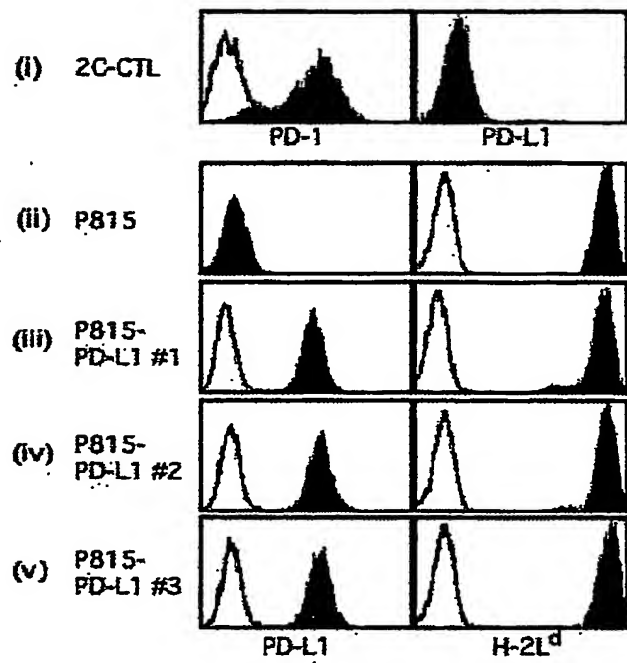
8 陽性 T 細胞の細胞増殖を示す。

【図 12】 ウイルス感染に対する PD-1 の関与を示す。図中 (g) ~ (n) は、アデノウイルス感染後 0 日および 7 日目での PD-1<sup>-/-</sup> マウスおよび wt マウスの肝臓のヘマトキシリン & エオジン組織染色像である。図中 (o) ~ (r) は、アデノウイルス感染後 0 日および 7 日目での PD-1<sup>-/-</sup> マウスおよび wt マウスの肝臓の X-Gal 染色像である。

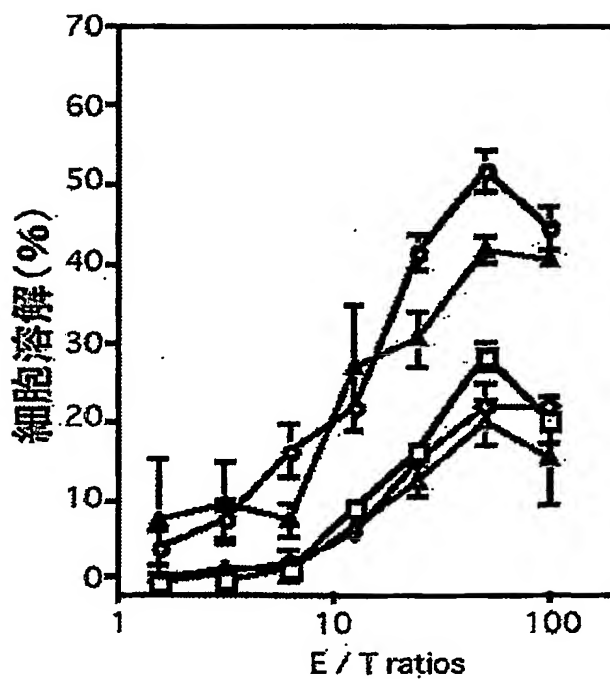
【書類名】 図面

【図 1】

(A)

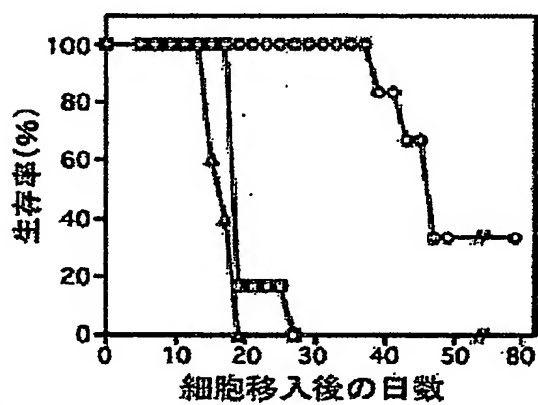
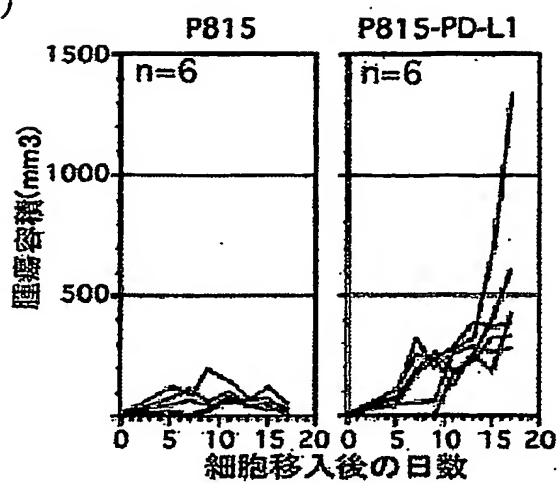


(B)

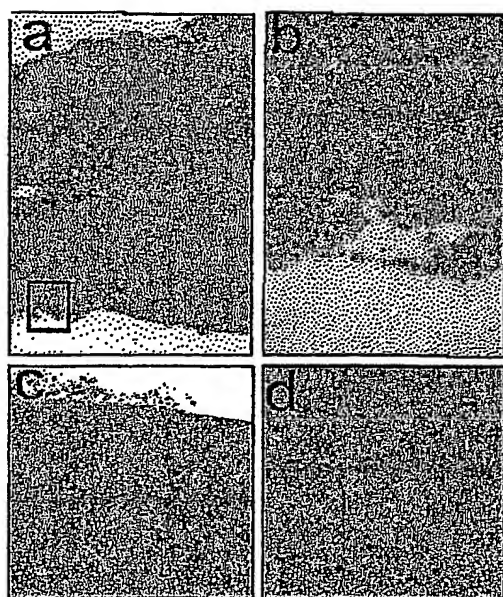


【図 2】

(A)



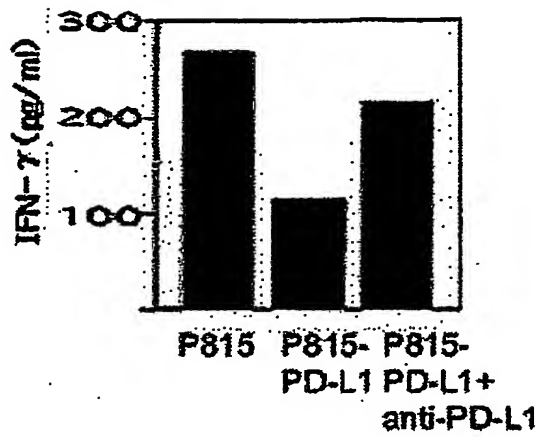
(B)



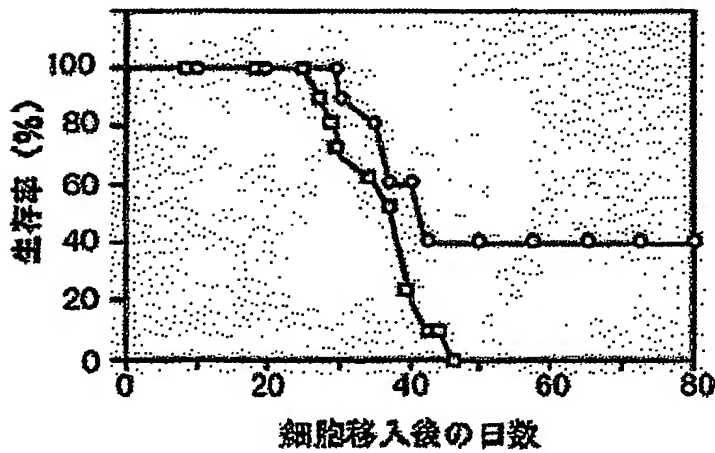
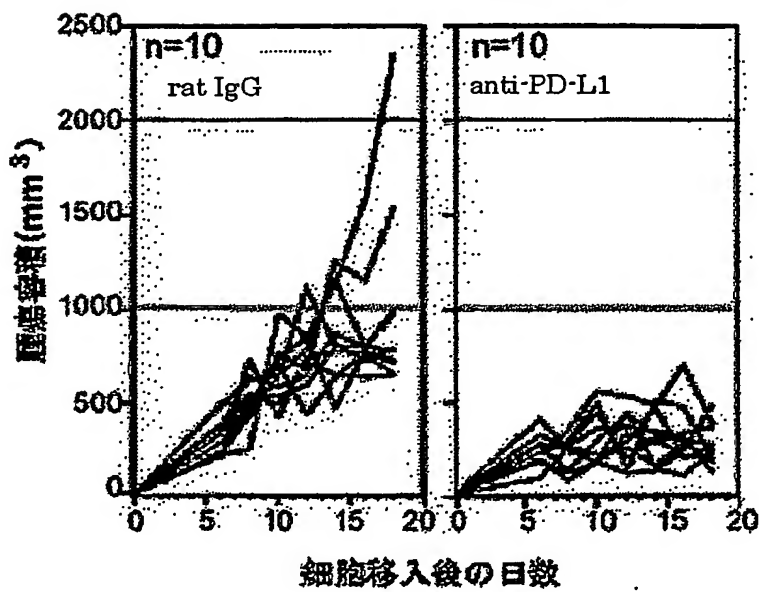


【図3】

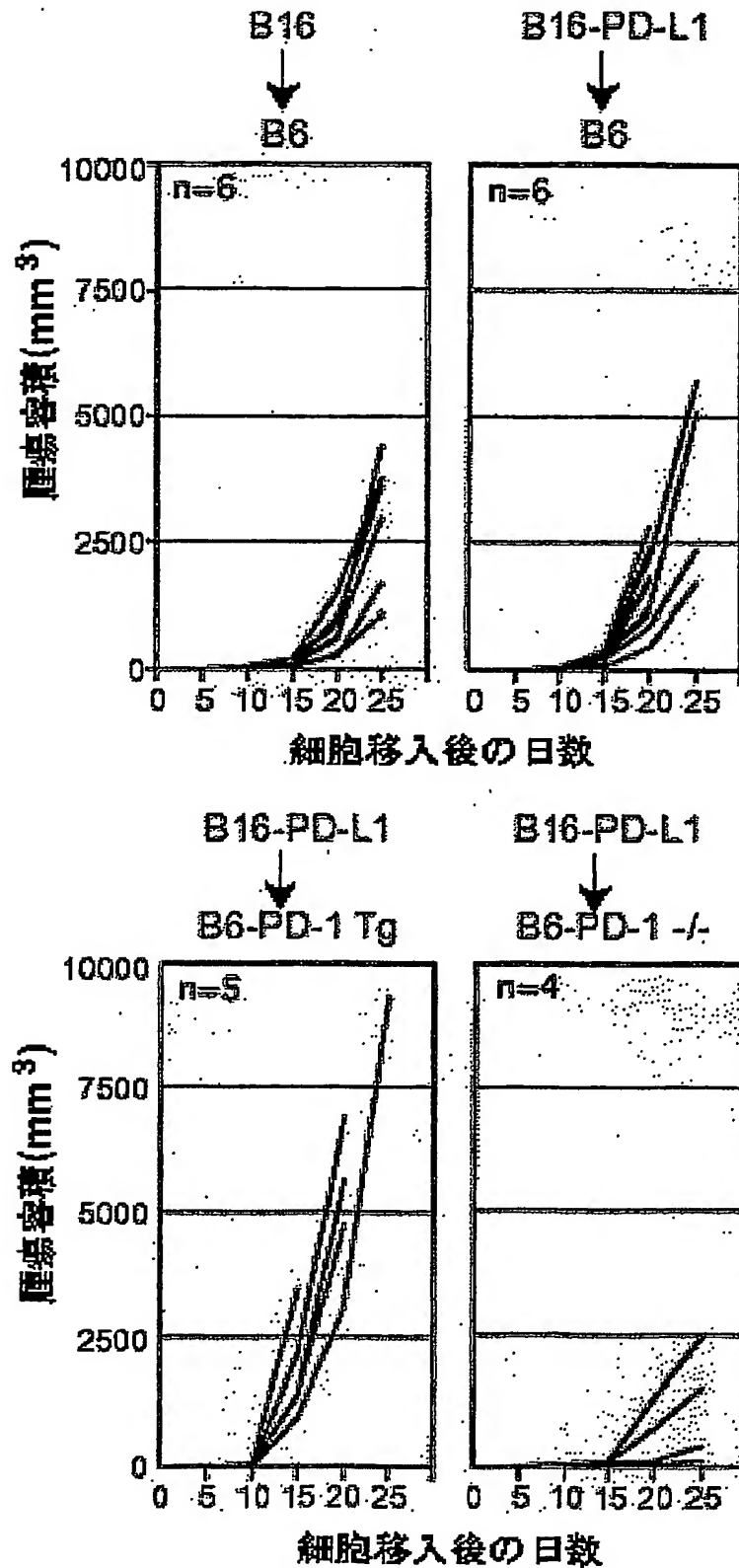
(A)



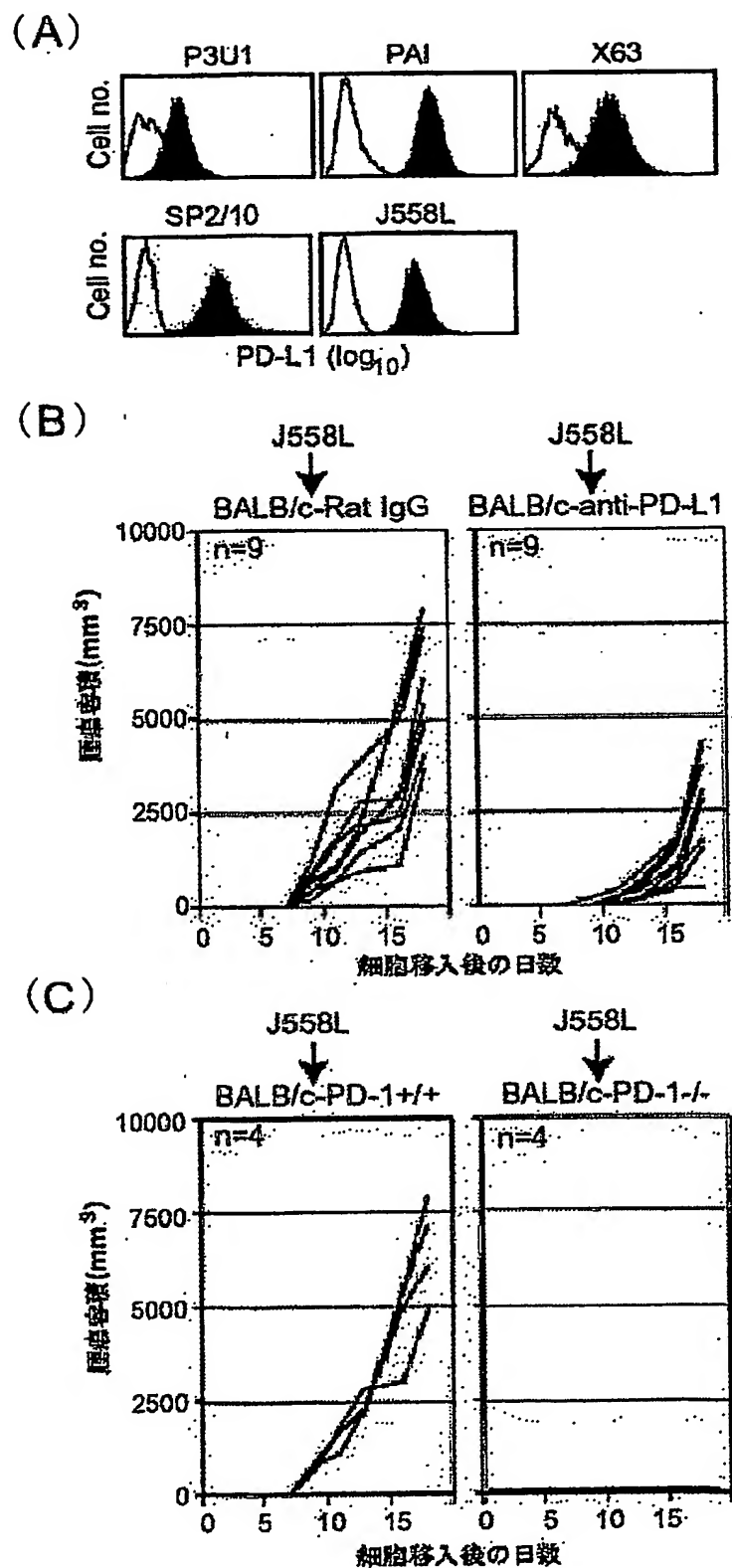
(B)



【図4】



【図 5】

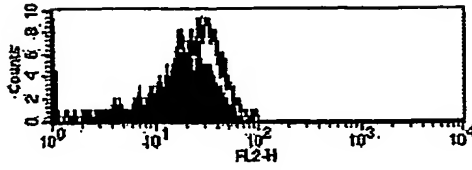


【図6】

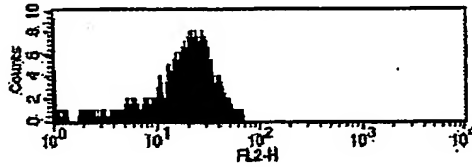
(A)

心臓血管内皮細胞

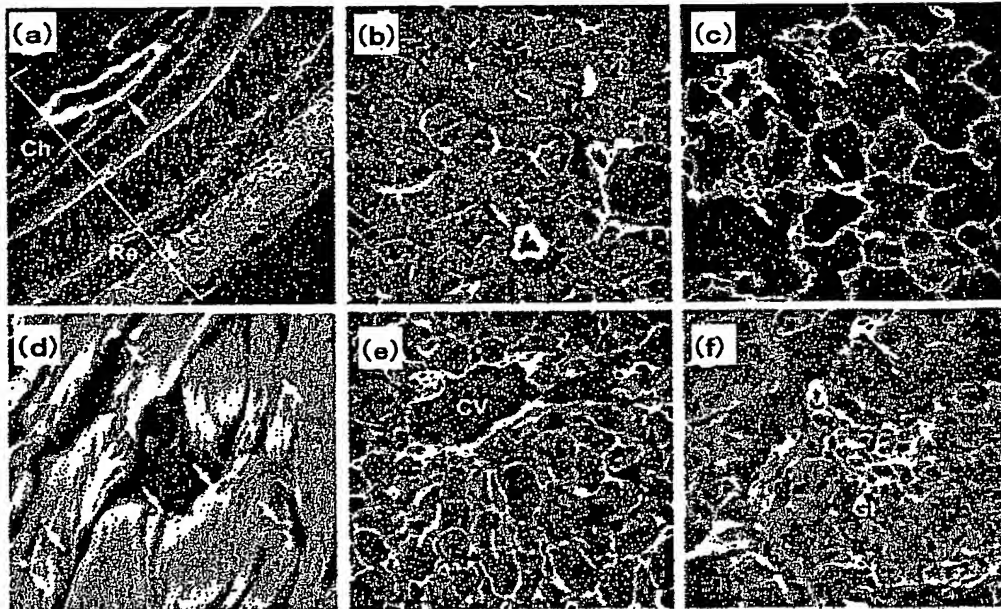
PD-L1



PD-L2

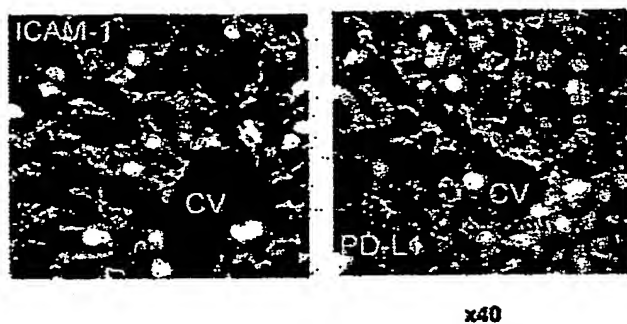


(B)

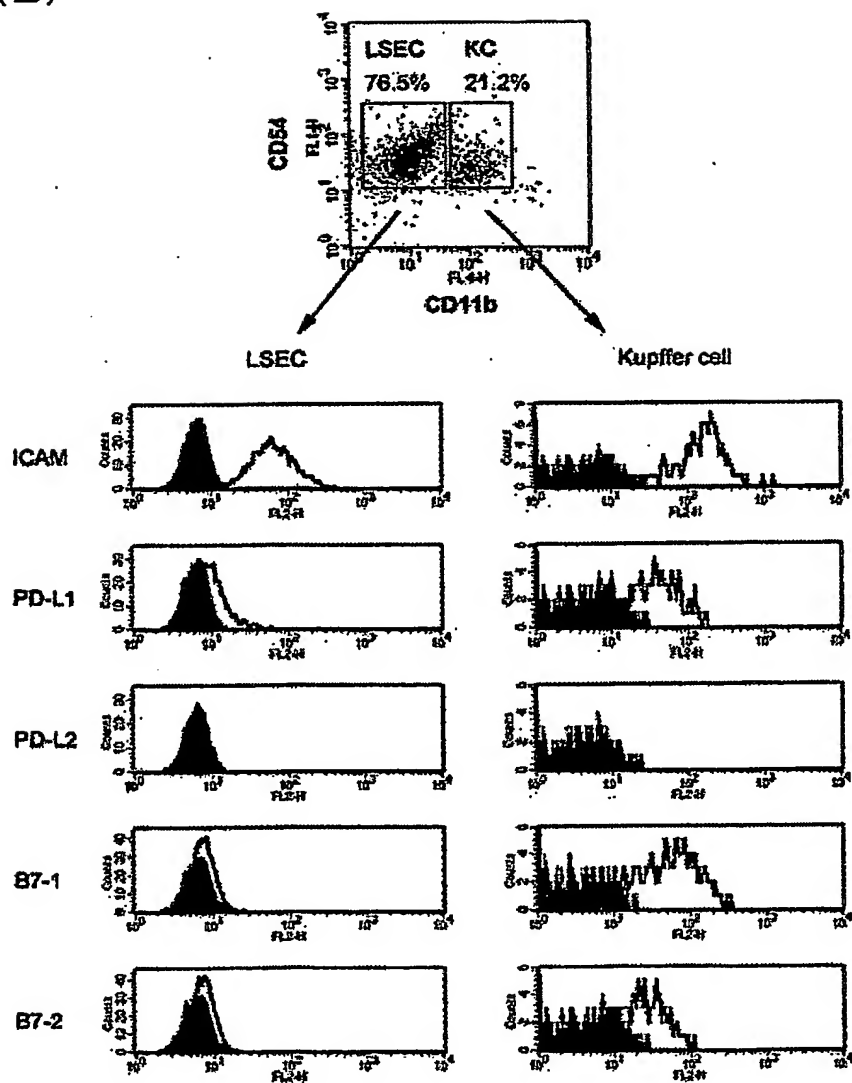


【図 7】

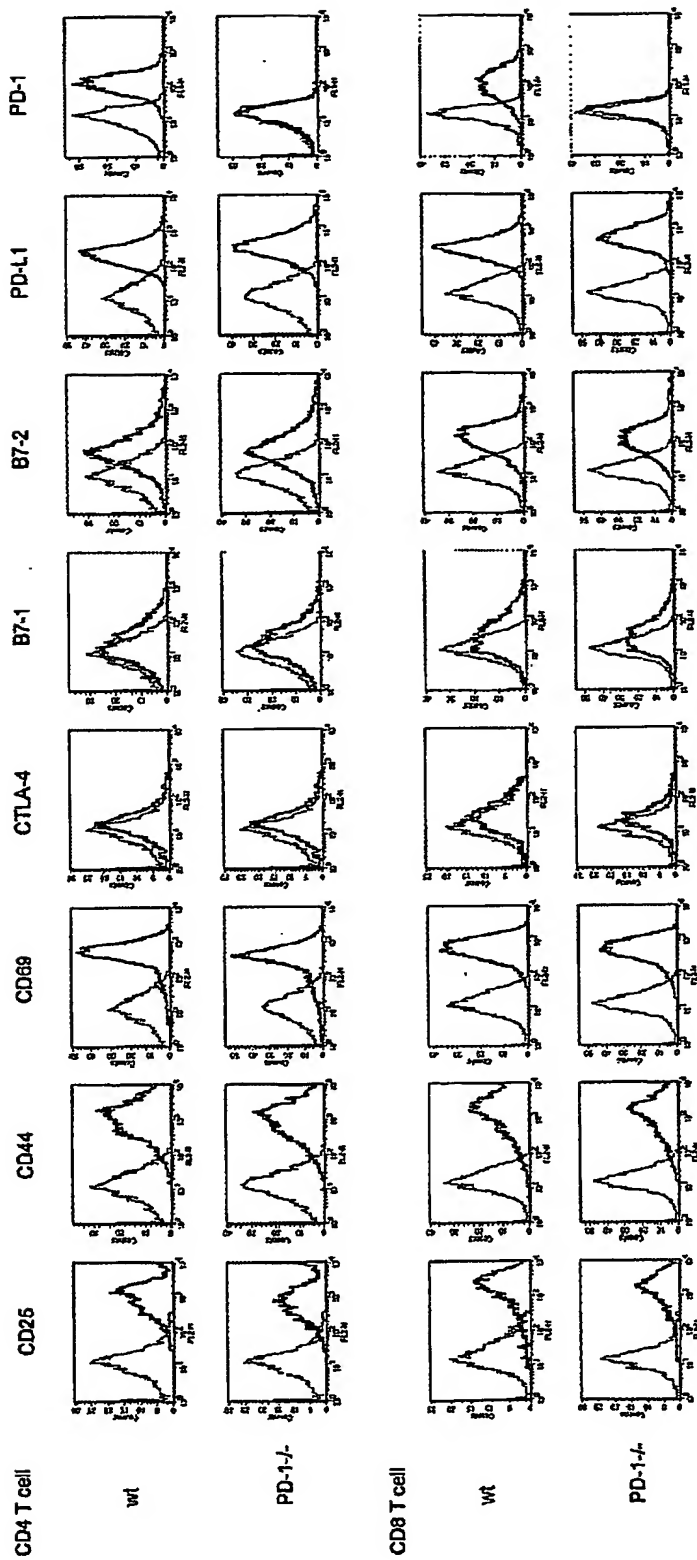
(A)



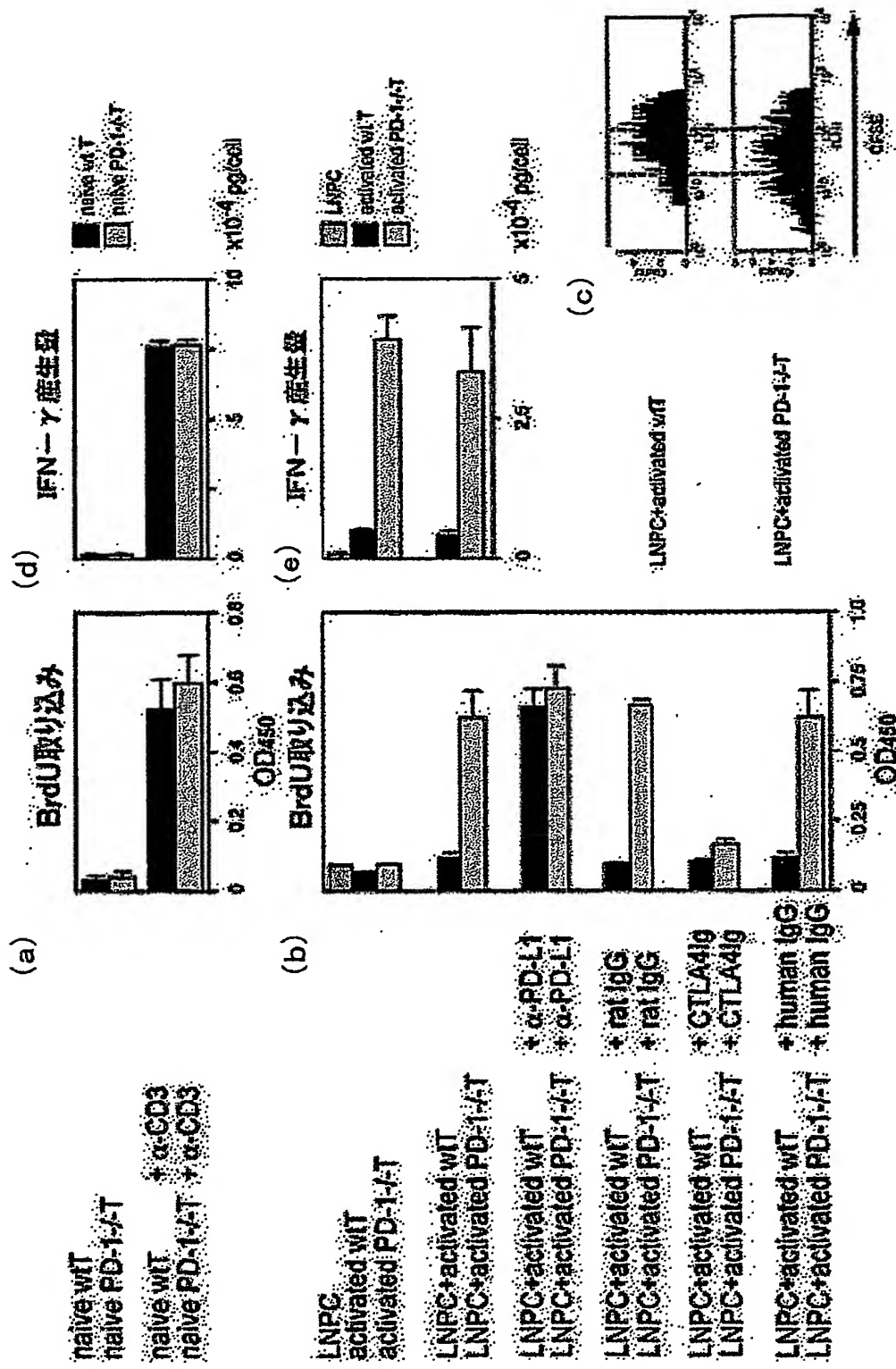
(B)



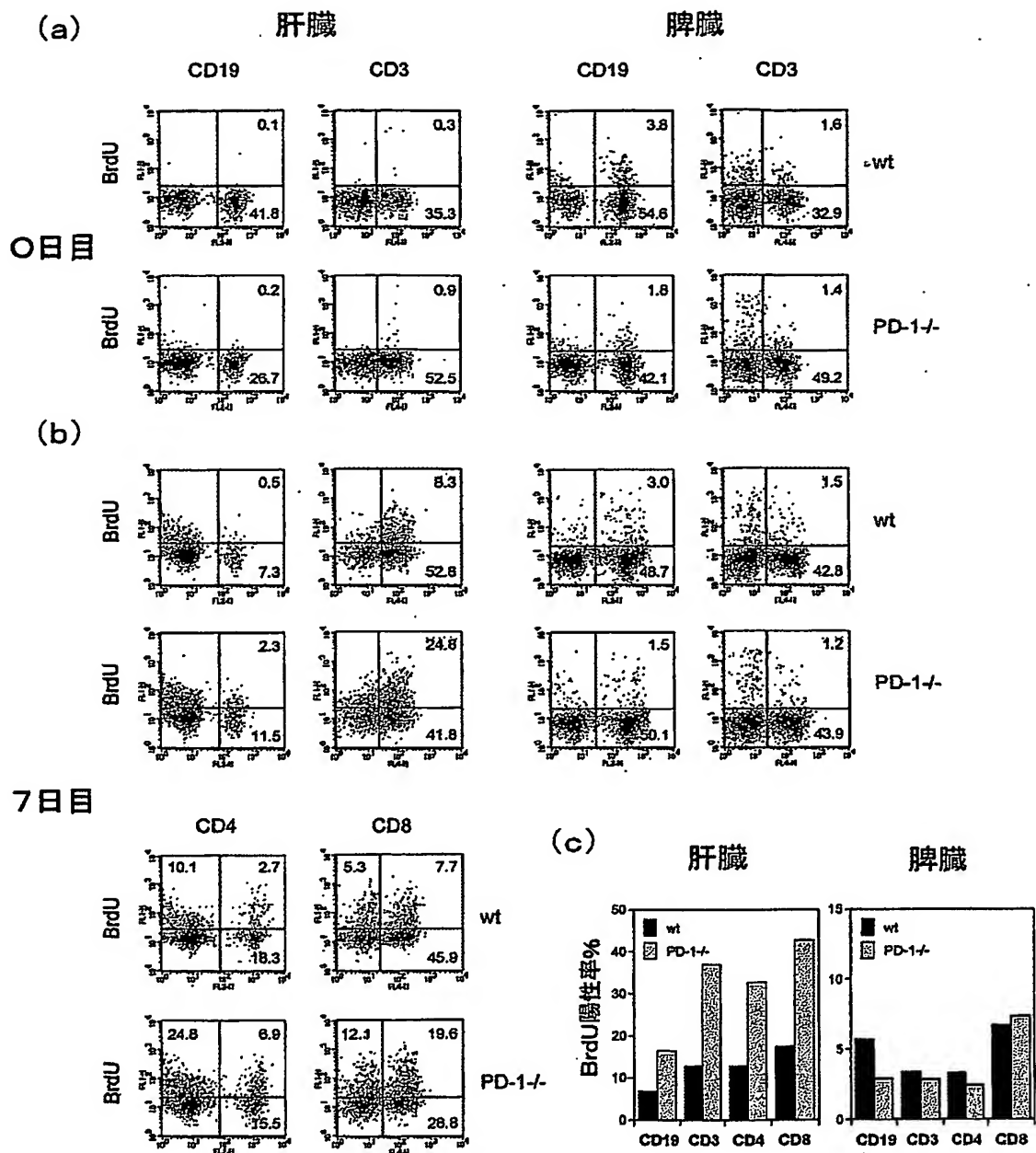
【図 8】



【図9】

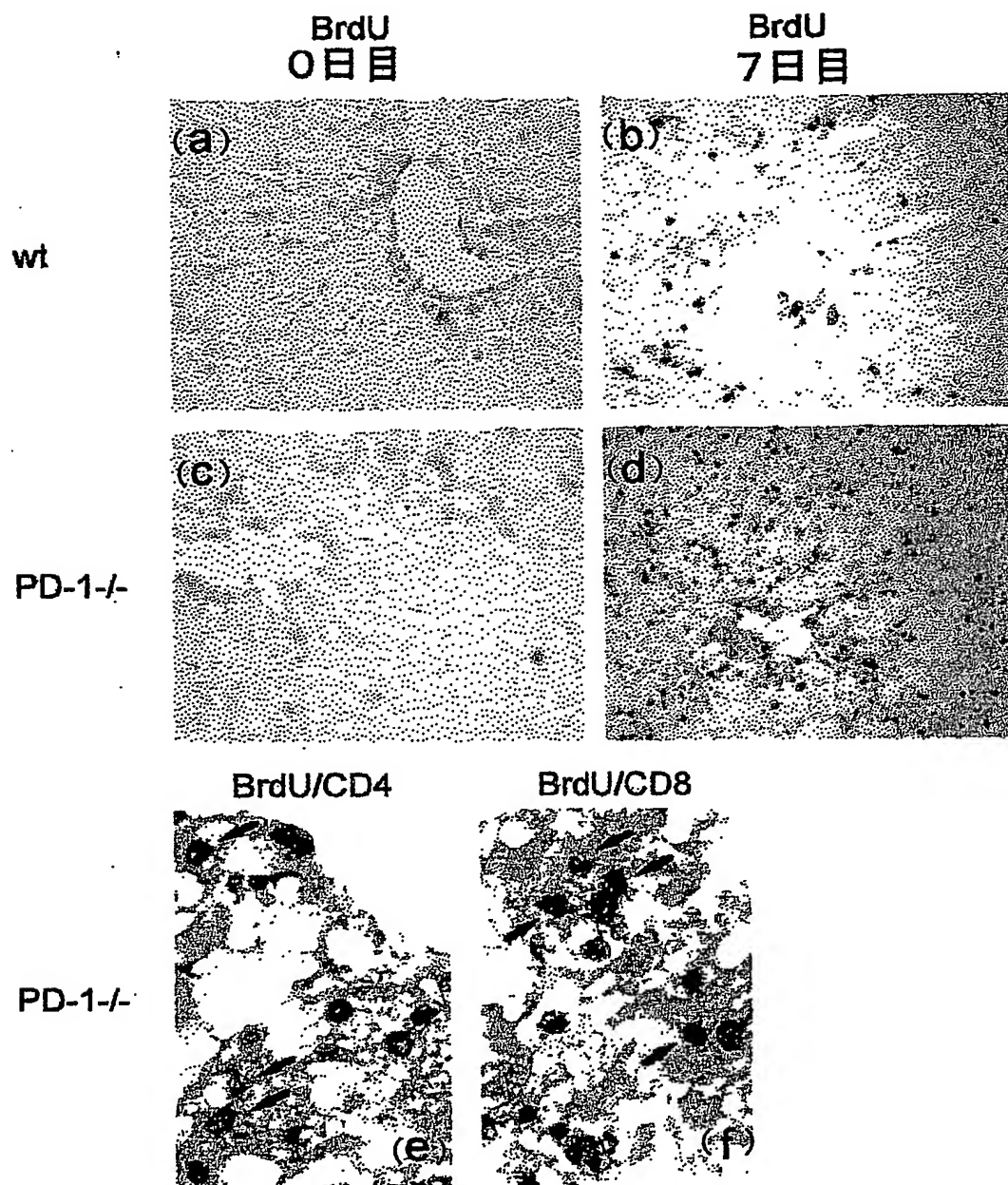


【図10】

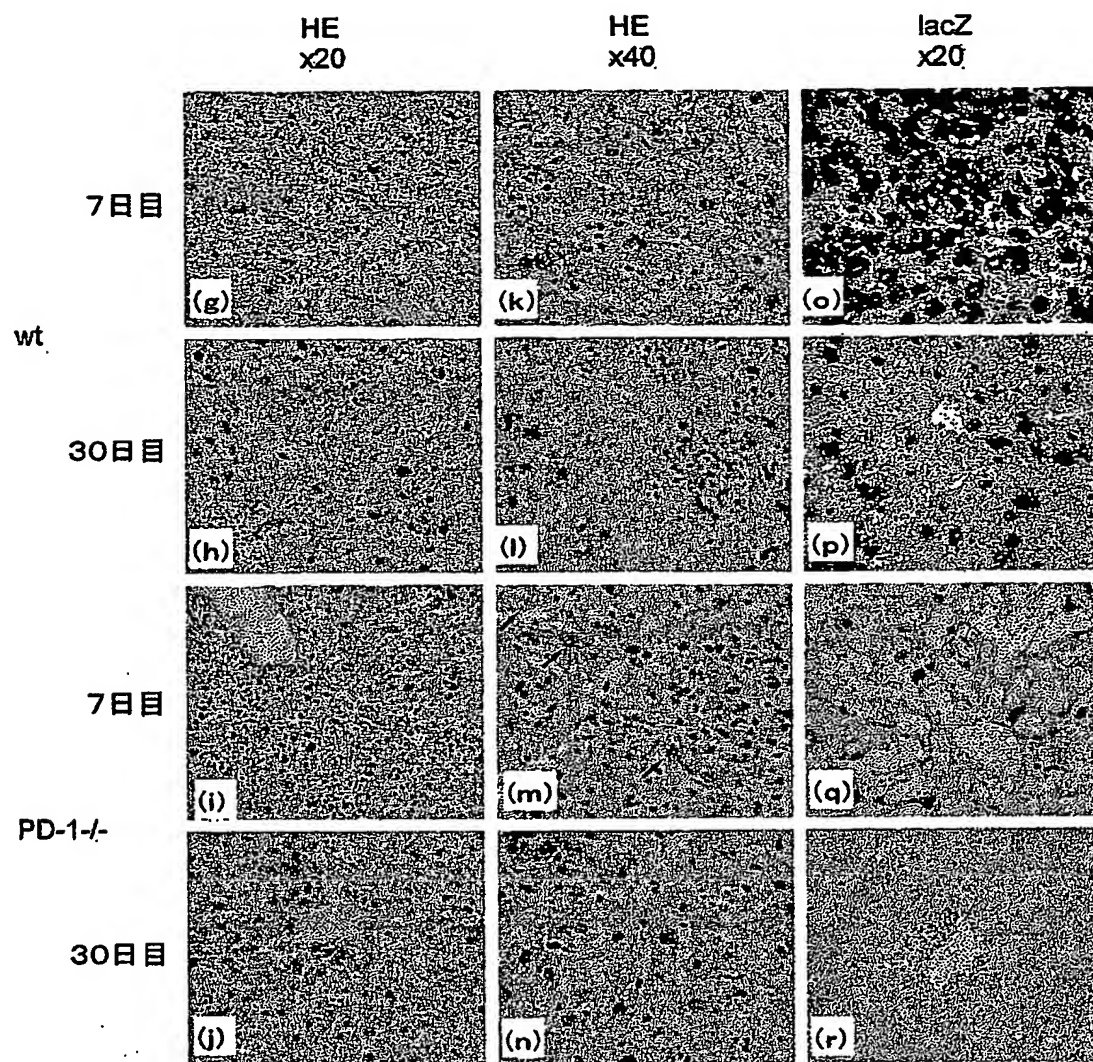




【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 PD-1、PD-L1またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする免疫賦活剤、該免疫賦活剤を用いた癌治療または感染症治療、癌または感染症治療のための免疫賦活剤インビトロスクリーニング方法およびインビボ評価法、該評価に用いられる腫瘍細胞株および腫瘍移植マウス、癌治療のための医薬組成物、感染症治療のための医薬組成物、および免疫反応を活性化させたリンパ球細胞。

【効果】 PD-1、PD-L1またはPD-L2の機能を阻害する本発明による免疫賦活剤は、癌もしくは感染症に対する治療に有用である。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-029846
受付番号	50300193039
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成15年 2月12日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000185983
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号
【氏名又は名称】	小野薬品工業株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】	396023812
【住所又は居所】	京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4
【氏名又は名称】	本庶 佑

## 【代理人】

申請人

【識別番号】	100081086
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第2ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	大家 邦久

## 【代理人】

【識別番号】	100117732
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第二ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	小澤 信彦

## 【代理人】

【識別番号】	100121050
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第2ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	林 篤史

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000185983]

1. 変更年月日 1990年 9月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

氏 名 小野薬品工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396023812]

1. 変更年月日 1998年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4

氏 名 本 庶 佑